



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2004115112/13, 18.10.2002

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.10.2002

(30) Конвенционный приоритет:
24.09.2003 US 60/343,657
24.09.2003 US 60/377,716

(43) Дата публикации заявки: 27.04.2005

(45) Опубликовано: 27.02.2008 Бюл. № 6

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: GRABMAIER K. et al. Int. J. Cancer:
85, 865-870 (2000). GREEN et al. Nat. Gen.
1994, 7(1): 13-17.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:
18.05.2004

(86) Заявка РСТ:
US 02/33470 (18.10.2002)

(87) Публикация РСТ:
WO 03/033674 (24.04.2003)

Адрес для переписки:
105064, Москва, ул. Казакова, 16, НИИР
Канцелярия "Патентные поверенные Квашнин,
Сапельников и партнеры", пат.пов. В.П.Квашнину

(72) Автор(ы):

ТАКЕУЧИ Тошихико (US),
ДЮБУА-СТРИНГФЕЛЛОУ Натали (US),
МЕРФИ Джон Е. (US),
РИНКЕНБЕРГЕР Джули (US)

(73) Патентообладатель(и):

БАЙЕР ФАРМАСЬЮТИКАЛС КОРПОРЕЙШН
(US)

(54) АНТИТЕЛА ЧЕЛОВЕКА, ОБЛАДАЮЩИЕ АКТИВНОСТЬЮ СВЯЗЫВАНИЯ С MN И НЕЙТРАЛИЗАЦИИ КЛЕТОЧНОЙ АДГЕЗИИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к моноклональным антителам человека к MN и фрагментам антител к MN, которые нацелены на повтор GEEDLP внутри протеогликанового домена. Связывание с желаемым эпитопом подтверждается методом конкурентного иммуноферментного анализа ELISA, в котором сигнал ELISA ослабляется при совместной инкубации с пептидом, содержащим этот повтор (PGEEDLPGEEDLP). Ингибирование связывания также может подтверждаться исследованием Biotcore, при котором связывание

требуемых антител с иммобилизованными MN или протеогликановыми белками может ингибироваться пептидным повтором. В дополнение к связыванию с пептидным повтором антитела человека анти-MN могут ингибировать адгезию клеток CGL-1 к пластиковым планшетам, покрытым MN. Антитела человека анти-MN могут быть применены для лечения раковых заболеваний, когда повышен уровень MN, или для диагностики раковых заболеваний, при которых повышен уровень MN. 10 з.п. ф-лы, 8 ил., 2 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2004115112/13, 18.10.2002**(24) Effective date for property rights: **18.10.2002**

(30) Priority:
24.09.2003 US 60/343,657
24.09.2003 US 60/377,716

(43) Application published: **27.04.2005**(45) Date of publication: **27.02.2008 Bull. 6**(85) Commencement of national phase: **18.05.2004**

(86) PCT application:
US 02/33470 (18.10.2002)

(87) PCT publication:
WO 03/033674 (24.04.2003)

Mail address:
105064, Moskva, ul. Kazakova, 16, NIIR
Kantsel'arija "Patentnye poverennye Kvashnin,
Sapel'nikov i partnery", pat.pov. V.P.Kvashninu

(72) Inventor(s):

TAKEUCHI Toshikhiko (US),
DJUBUA-STRINGFELLOU Natali (US),
MERFI Dzhon E. (US),
RINKENBERGER Dzhuli (US)

(73) Proprietor(s):

BAJER FARMAS'JuTIKALS KORPOREJShN (US)(54) **HUMAN ANTIBODY POSSESSING BINDING ACTIVITY WITH MN AND NEUTRALIZATION OF CELLULAR ADHESION**

(57) Abstract:

FIELD: immunology, antibodies.

SUBSTANCE: invention relates to human monoclonal antibodies to MN and antibody fragments to MN that are targeted to repeat sequence GEEDLP within proteoglycan domain. Binding with a desired epitope is confirmed by competitive immunoenzyme analysis method ELISA wherein ELISA signal is attenuated in combined incubation with peptide comprising this repeat sequence (PGEEDLPGEEDLP). Binding inhibition can be confirmed by the Biacore study also wherein

binding required antibodies with immobilized MN or proteoglycan peptides can be inhibited by peptide repeat sequence. In addition to binding with human peptide repeat sequence anti-MN can inhibit adhesion of CGL-1 cells to plastic plates covered by MN. Human antibodies anti-MN can be used in treatment of cancer diseases or for diagnosis of cancer diseases wherein the level of MN is increased.

EFFECT: valuable medicinal properties of antibodies.

11 cl, 8 dwg, 2 tbl, 13 ex

Текст описания приведен в факсимильном виде.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам человека, связывающимся с MN.

5

Предшествующий уровень техники

MN – это белок клеточной поверхности, обнаруженный в ряде клинических образ-
цов карциномы, но отсутствующий в нормальной ткани соответствующих органов.
Была проклонирована кДНК MN (Pastorek, J. et al., *Oncogene* (1994), 9, 2877-2888),
предсказанный белок состоит из сигнального пептида, протеогликан-связанной по-
следовательности, домена карбоновой ангидразы, трансмембранного сегмента и ко-
роткого внутриклеточного конца. В норме MN экспрессируется в слизистой оболоч-
ке желудка и желчного протока (Liao, S.Y., et al., *Am. J Pathol* (1994), 145, 598-609) и
в высокопролиферирующих нормальных клетках, расположенных в тонкой кишке
(Saarnio, J. et al., *J Histochem Cytochem* (1998) 46, 497-504). Однако, MN эктопически
экспрессируется в 100% гипернефроидных опухолей почки (Liao, S.Y., *Cancer Res*
(1997) 57, 2827-2831), 100% карцином пищевода (Turner, J.R. *Hum Pathol* (1997) 28,
740-744), более 90% карцином шейки матки (Liao, S.Y., et al., *Am. J Pathol* (1994),
145, 598-609), 76% злокачественных карцином ободочной кишки (Saarnio, J. et al.,
Am. J Pathol (1998) 153, 279-285), 80% немелкоклеточных карцином легкого (Ver-
mylen, P. et al., *Eur Respir J* (1999) 14, 806-811) и в 48% рака молочной железы (Chia,
S.K. et al., *J Clin Oncol* (2001) 19, 3660-3668).

Были описаны антитела к MN. Моноклональное антитело мыши G250 эффективно в
снижении размеров гипернефроидной опухоли почки на модели мыши (van Dijk, J. et
al., *Int. J. Cancer* (1994) 56, 262-268). Позднее на основе этого антитела было создано
химерное антитело, содержащее участки Fc человека и мышинные вариабельные уча-
стки. Химерное антитело G250 только на 66% человеческое, что приводит к более
высокой вероятности иммуногенности у человека по сравнению с полностью чело-
веческим антителом. Таким образом, лечение антителом, являющимся на 33% мы-
шиным, может привести к анти-мышинному иммунному ответу у человека, что делает

50

антираковое лечение неэффективным. Эти проблемы с химерными антителами обуславливают необходимость получения полностью человеческих антител к MN.

5

Краткое описание изобретения

10

15

20

25

30

35

Изобретение включает моноклональные антитела человека к MN или фрагменты антител к MN, имеющие мишенью повторы GEEDLP внутри протеогликанового домена. Протеогликановый домен белка клеточной поверхности MN содержит четыре идентичных повтора GEEDLP. Связывание с требуемым эпитопом подтверждается конкурентным ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), в котором сигнал ELISA может быть снижен при совместной инкубации с пептидом, содержащим этот повтор (PGEEDLPGEEDLP). Ингибирование связывания также может быть подтверждено при использовании анализа BIAcore, в котором связывание требуемых антител с иммобилизованными MN или протеогликановыми пептидами может ингибироваться пептидным повтором. В дополнение к связыванию с пептидным повтором антитела человека анти-MN могут ингибировать адгезию клеток CGL-1 к пластиковым планшетам, покрытым MN. Человеческие антитела анти-MN использовали для определения и измерения экспрессии MN в раковых клетках и опухолях при использовании метода FACS и иммуногистохимических методов. Также приведен пример, в котором человеческий анти-MN IgG1 опосредует лизис раковых клеток путем зависимой от антител опосредованной клетками цитотоксичности. Таким образом, эти антитела будут применимы в лечении раковых заболеваний, при которых повышается уровень MN, или могут быть применимы для диагностики раковых заболеваний, при которых повышается уровень MN.

Краткое описание чертежей

40

Фиг.1 Клетки рака простаты человека PC3mm2 экспрессируют MN, что подтверждается анализом FACS.

45

Фиг.2 Идентификации последовательностей под номерами SEQ ID с 1 по 83.

Фиг.3 Fab display вектор pMORPH18 Fab1

50

Фиг.4 Карта вектора pMORPHx9_Fab1_FS

Фиг.5 Изображение блокировки клеточной адгезии анти-MN антителом MN-3

Фиг.6 Связывающиеся пары антитела для антител к MN с 1 по 39. Приведена аффинность связывания по BIAcore.

Подробное описание изобретения

Изобретение включает антитела человека, связывающиеся с MN. Эти антитела применимы для различных терапевтических и диагностических целей. К этим целям относятся:

Характеристика антител человека к MN

В настоящем документе термин "антитело" означает как целые иммуноглобулиновые молекулы (напр., IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, IgD, IgE, IgA), так и их фрагменты, такие как Fab, F(ab')₂, scFv и Fv, которые способны специфически связываться с эпитопом белка MN человека. В иммунохимическом анализе сигнал детекции антител, специфически связывающихся с MN, по крайней мере, в 5, 10 или 20 раз выше, чем сигнал детекции, получаемый с другими белками. Предпочтительно, чтобы антитела, специфически связывающиеся с MN, не обнаруживали других белков в иммунохимическом анализе и могли высаживать MN из раствора.

Ссылки на VL2 и/или VL3 в настоящем описании означают класс лямбда (λ) легкой цепи.

K_d антитела человека, связывающегося с MN, может быть получена любым методом, известным в данной области техники, включая такие технологии, как анализ бимолекулярного взаимодействия в реальном времени (BIA) (Sjolander & Urbaniczky, *Anal. Chem.* 63, 2338-2345, 1991, и Szabo et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 699-705, 1995). BIA – это технология для изучения биоспецифических взаимодействий в реальном времени, без мечения какого-либо из взаимодействующих веществ (например, BIAcore™). Изменения оптического явления поверхностного плазмонного резонанса (SPR) могут быть использованы как индикация реакций в реальном времени между биологическими молекулами.

В исследовании BIAcore™ антитела человека, описанные в настоящем изобретении, специфически связываются с MN человека с константой K_d в пределах от приблизительно 0,6 нМ (6×10^{-10} М) до приблизительно 1800 нМ ($1,8 \times 10^{-10}$ М), см. Фиг.1.

5 Более предпочтительные антитела человека по настоящему изобретению специфически связываются с MN человека с константой K_d в пределах от приблизительно 0,6 нМ до приблизительно 90 нМ, наиболее предпочтительные антитела настоящего изобретения связываются с белком человека MN с K_d приблизительно 4 нМ.

10

Как предполагается, предпочтительно, чтобы антитела согласно настоящему изобретению связывались с повтором GEEDLP в протеогликановом домене, содержащем четыре таких идентичных повтора. Связывание с требуемым эпитопом может быть подтверждено при использовании любого метода, известного в данной области техники, включая такие методы, как конкурентный ELISA (Zavada et al., *Br. J. of Cancer* 82, 1808-1813, 2000), в котором сигнал ELISA может быть снижен при совместной инкубации с пептидом, содержащим этот повтор (PGEEDLPGEEDLP), но не ингибируется похожим пептидом (PSEEDSPREEDP), который также находится в протеогликановом домене. Такая модель ингибирования связывания также может быть подтверждена при использовании технологий BIAcore™, в которых связывание требуемых антител с иммобилизованными MN или протеогликановыми пептидами может ингибироваться инкубацией с пептидным повтором. Предпочтительно, чтобы антитела настоящего изобретения также могли ингибировать клеточную адгезию клеток, экспрессирующих MN, к пластиковым планшетам для ELISA, покрытым MN (Zavada et al., *Br. J. of Cancer* 82, 1808-1813, 2000).

15

20

25

30

35

В настоящем исследовании применяется технология фаг-антитело Morphosys для получения полностью человеческих антител к белку MN. Библиотека Morphosys основана на материале человека, что значительно снижает возможность иммуногенности.

40

Путем скринирования библиотеки MorphoSys HuCAL Fab (комбинаторная библиотека антител человека Fab) были идентифицированы несколько антител человека, обладающих описанными выше характеристиками связывания с MN и нейтрализации клеточной адгезии. Были разработаны кассеты CDR, собранные для библиотеки HuCAL, для получения распределения длин от 5 до 28 аминокислотных остатков,

45

50

покрывающих расстояние от положения 95 до 102. Knappik et al., *J. Mol. Biol.* 296, 57-86, 2000. В некоторых вариантах осуществления изобретения область VH3-CDR3 антитела человека имеет аминокислотную последовательность, приведенную на Фиг. 2 под номерами SEQ ID NOS: 61-80. В других вариантах осуществления изобретения области VL λ 1-CDR3, VL λ 2-CDR3 и VL λ 2-CDR1 антитела человека к MN имеют аминокислотные последовательности, приведенные на Фиг.2 под номерами SEQ ID NOS: 81-89, оптимизированные последовательности VH3-CDR1 приведены под номерами SEQ ID NOS: 48-60, и то, и другое приведено на Фиг.2. Антитела человека, обладающие активностью связывания с MN и нейтрализации клеточной адгезии, приведены в Таблицах 1 и 2; переменные области в этих антителах (петли CDR3) приведены в Таблицах 1 и 2.

Получение антител человека

Антитела человека с активностью связывания с MN и нейтрализации клеточной адгезии, описанные выше, можно идентифицировать из библиотеки MorphoSys HuCAL следующим образом. Планшет для микротитрования покрывают MN человека и инкубируют с фаговой библиотекой MorphoSys HuCAL-Fab (см. Пример 1). Связанные с фагом Fab, не связывающиеся с MN, можно смыть с планшета, и остается только фаг, который крепко связывается с MN. Связанный фаг можно элюировать сменой pH и накопить заражением *E. coli*. Такой процесс отбора можно повторить один или два раза для обогащения популяции связанных с фагом антител, которые крепко связываются с MN. Затем Fab из обогащенного пула экспрессируют, очищают и проверяют в анализе ELISA. Затем идентифицированные объекты исследуют на связывание при помощи анализа BIAcore™, далее эти объекты можно проверить в исследовании клеточной адгезии, как описано выше.

В начальном отборе из библиотеки HuCAL-Fab в первом раунде в качестве антигена можно использовать MN, во втором раунде – пептиды MN, слитые с белками-носителями, такими как BSA (бычий сывороточный альбумин) или трансферрин, а в третьем раунде – снова MN. К белкам MN человека, которые можно использовать для исследования, относятся MN человека под номерами SEQ ID NOS: 45-47. Эти пептидные последовательности получены из протеогликановой последовательности MN, предполагается, что они участвуют в клеточной адгезии.

Иначе, отбор можно проводить при использовании в качестве антигена клеток, экспрессирующих MN. Например, клетки, трансфицированные антигеном MN, можно пометить биотином. Затем эти трансфицированные клетки смешивают с немечеными, не трансфицированными MN клетками в соотношении меченых к немеченым 1:10. К клеткам добавляют фаговую библиотеку, и биотинилированные клетки, несущие MN, улавливают покрытыми стрептавидином магнитными бусинами, которые связываются с магнитом. Неспецифический фаг смывают, а клетки, несущие MN, специфически элюируют удалением магнитного поля. Эти специфически связанные фаги можно амплифицировать для дальнейших раундов отбора клеток или можно заменить пептидным и/или белковым отбором.

Подробно процесс скрининга описан ниже, в конкретных примерах. Специалист в данной области техники может представить себе и другие методы отбора высоко-специфичных антител или фрагментов антител и применить их для идентификации антител к MN.

Антитела человека с описанными выше характеристиками также можно выделить из любых клеток, экспрессирующих антитела, включая клетки-хозяева, трансфицированные кодирующими антитело конструкциями для экспрессии. Клетки-хозяева культивируют в условиях, при которых экспрессируются антитела человека. Выделенное антитело человека отделяют от других соединений, которые в норме ассоциированы с антителом в клетке, таких как определенные белки, углеводы или липиды, при помощи методов, известных в данной области техники. К таким методам относятся, без ограничения, гель-фильтрация, фракционирование с сульфатом аммония, ионообменная хроматография, аффинная хроматография и препаративный гель-электрофорез. Степень чистоты выделенных антител человека составляет, по крайней мере, 80%; предпочтительная степень чистоты – 90%, 95% или 99%. Чистота препаратов может быть достигнута любыми методами, известными в данной области техники, такими как электрофорез в SDS-полиакриламидном геле. Препарат выделенных антител человека по настоящему изобретению может содержать более одного типа антител человека с характеристиками связывания с MN и нейтрализации клеточной адгезии, описанными выше.

Иначе, антитела человека можно получить химическими методами синтеза аминокислотной последовательности, например, прямым пептидным синтезом при использовании твердофазных процессов (Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154, 1963; Roberge et al., *Science* 269, 202-204, 1995). Белковый синтез можно осуществлять вручную или автоматически. Автоматический синтез можно проводить, например, при использовании синтезатора Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer). Как вариант, можно синтезировать фрагменты антител человека по отдельности и соединить их в полноразмерную молекулу, используя химические методы.

Вновь синтезированные молекулы можно очистить препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографией (например, Creighton, *PROTEINS: STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES*, WH Freeman and Co., New York, N.Y., 1983). Состав синтетического полипептида может быть подтвержден аминокислотным анализом или секвенированием (например, используя деградацию Эдмана).

Оценка терапевтической применимости антител человека

Для оценки терапевтической применимости конкретного антитела в лечении рака, например, можно протестировать антитело *in vivo* на мышинной модели с ксенотрансплантатом опухоли. При желании, перед терапевтической оценкой антитела человека Fab MN можно превратить в антитела IgG₁. Это преобразование описано в Примере 5, а пример терапевтической модели подробно описан в Примере 9. Применимость также можно протестировать при использовании анализа зависимой от антитела опосредованной клеткой цитотоксичности, как описано в Примере 13.

Полинуклеотиды, кодирующие антитела человека к MN

Изобретение также обеспечивает полинуклеотиды, кодирующие антитела человека к MN. Эти полинуклеотиды могут использоваться, например, для количественного получения антител для терапевтических или диагностических целей.

Полинуклеотиды, которые могут быть использованы для кодирования областей VH-CDR3, приведены в последовательностях под номерами SEQ ID NOS: 14-33. Полинуклеотиды, которые могут быть использованы для кодирования областей VL-CDR3, приведены в последовательностях под номерами SEQ ID NOS: 34-44. Полинуклеотиды, кодирующие тяжелые и легкие цепи антител человека согласно изобре-

тению, выделенных из библиотеки MorphoSys HuCAL, приведены на Фиг.2. Дополнительные оптимизированные последовательности VH3-CDR1 приведены под номерами SEQ ID NOS: 1-13.

5

Полинуклеотиды согласно изобретению, присутствующие в клетках-хозяевах, можно выделить свободными от других клеточных компонентов, таких как компоненты мембраны, белки и липиды. Полинуклеотиды могут производиться клеткой, и их можно выделить с использованием стандартных методов очистки нуклеиновых кислот, или полинуклеотиды могут быть синтезированы методом амплификации, таким как полимеразная цепная реакция (ПЦР), или при использовании автоматического синтезатора. Методы выделения полинуклеотидов являются рутинными и известны в данной области техники. Любой из таких методов получения полинуклеотида применим для получения отдельных полинуклеотидов, кодирующих антитела согласно изобретению. Например, для выделения полинуклеотидов, кодирующих антитела, можно использовать ферменты рестрикции и зонды. Препараты выделенных нуклеотидов свободны от других молекул, по крайней мере, на 70, 80 или 90%.

20
25

Молекулы кДНК, кодирующие антитела человека согласно изобретению могут быть получены стандартными методами молекулярной биологии при использовании в качестве матрицы мРНК. Затем молекулы кДНК могут быть реплицированы при использовании методов молекулярной биологии, известных в данной области техники и описанных в руководствах типа Sambrook et al. (1989). Для получения дополнительных копий полинуклеотидов можно использовать метод амплификации, такой как ПЦР.

30
35

Иначе, для синтеза полинуклеотидов, кодирующих антитела согласно изобретению, можно применять методы синтетической химии. Вырожденность генетического кода позволяет изменять нуклеотидные последовательности, которые нужно синтезировать и которые будут кодировать антитело, содержащее, например, аминокислотные последовательности одной из областей VH-CDR3, VH-CDR1 или VL-CDR3, легкой или тяжелой цепи, приведенные под номерами SEQ ID NOS:48-89, соответственно.

40
45

50

Экспрессия полинуклеотидов

Для экспрессии полинуклеотида, кодирующего антитело человека согласно изобретению, полинуклеотид можно вставить в вектор для экспрессии, который содержит
 5 элементы, необходимые для транскрипции и трансляции вставленной кодирующей последовательности. Для конструирования экспрессионных векторов, содержащих последовательности, кодирующие антитела человека, и соответствующие транскрипционные и трансляционные контрольные элементы, можно применять методы,
 10 хорошо известные специалистам в данной области техники. К этим методам относятся методы рекомбинации ДНК *in vitro*, синтетические методы и методы генетической рекомбинации *in vivo*. Такие методы описаны, например, в руководстве Sambrook et al. (1989) и Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1995. Также см. Примеры 1-3 ниже.

Для хранения и экспрессии последовательностей, кодирующих антитело человека согласно изобретению, можно использовать различные экспрессионные системы вектор/хозяин. К ним относятся, без ограничения, микроорганизмы, такие как бактерии,
 25 трансформированные рекомбинантным бактериофагом, плазмидными или космидными векторами для экспрессии ДНК; дрожжи, трансформированные дрожжевыми экспрессионными векторами, системы клеток насекомых, трансформированных вирусными экспрессионными векторами (например, бакуловирусом), системы
 30 клеток растений, трансформированных вирусными экспрессионными векторами (например, вирусом мозаики цветной капусты, CaMV; вирусом табачной мозаики, TMV) или бактериальными экспрессионными векторами (например, плазмидами Ti или pBR322), или системы клеток животных.

К контрольным или регуляторным последовательностям относятся нетранслируемые области вектора – экансеры, промоторы, 5'- и 3'- нетранслируемые области – которые взаимодействуют с белками клетки-хозяина для осуществления транскрипции и трансляции. Такие элементы могут различаться по силе и специфичности. В зависимости от векторной системы и хозяина может применяться любое количество походящих транскрипционных и трансляционных элементов, включая нерегулируемые и индуцибельные промоторы. Например, при клонировании в бактериальных системах
 45 можно использовать индуцибельные промоторы, такие как гибридный промотор lacZ фаремиды BLUESCRIPT (Stratagene, LaJola, Calif.) или плазмиды pSPORT1) Life

Technologies) и подобные. В клетках насекомых можно использовать полиэдриновый промотор бакуловируса. В вектор могут быть проклонированы промоторы или энхансеры, полученные из геномов растительных клеток (например, генов белков теплового шока, RUBISCO и запасных белков) или из вирусов растений (например, вирусные промоторы или лидерные последовательности). В системах клеток млекопитающих предпочтительно использовать промоторы генов млекопитающих или вирусов млекопитающих. Если требуется создать линию клеток, содержащих множественные копии нуклеотидной последовательности, кодирующей антитело человека, можно использовать векторы, основанные на SV40 или EBV, с соответствующими селективными маркерами.

Фармацевтические композиции

Любое из описанных выше антител человека к MN может входить в состав фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель. Предпочтительно, чтобы фармацевтически приемлемый носитель был апиrogenным. Композиции могут вводиться отдельно или в комбинации с, по крайней мере, одним другим агентом, таким как стабилизатор, который может вводиться в любом стерильном, биосовместимом фармацевтическом носителе, включая, без ограничения, солевой раствор, буферный солевой раствор, декстрозу и воду. Могут применяться различные водные носители, например, 0,4% солевой раствор, 0,3% глицин и подобные. Эти растворы стерильны и, как правило, не содержат частиц вещества. Эти растворы можно стерилизовать любым традиционным, хорошо известным методом (например, фильтрованием). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества для приближения к физиологическим условиям, например, агенты, влияющие на уровень pH и буферные агенты. Концентрация антитела согласно изобретению в таких фармацевтических составах может колебаться в широких пределах, т.е. от менее около 0,5%, обычно от, по крайней мере, около 1% до около 15 или 20% по массе, концентрацию выбирают, основываясь главным образом на объемах жидкости, вязкости и т.д. согласно конкретному выбранному способу введения. См. патент США 5,851,525. При желании в фармацевтическую композицию может входить более одного типа антител, например с разным значением K_d связывания с MN.

Композиции можно вводить пациенту отдельно или в комбинации с другими агентами, лекарствами или гормонами. В дополнение к активным ингредиентам эти композиции могут содержать подходящие фармацевтически приемлемые носители, включающие наполнители и вспомогательные вещества, способствующие переработке активных соединений в препараты, которые могут применяться фармацевтически. Фармацевтические композиции согласно изобретению можно вводить любыми путями, включая, без ограничения, оральный, внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, внутримозговой, интратекальный, интравентрикулярный, трансдермальный, подкожный, внутрибрюшинный, интраназальный, парентеральный, местный, сублингвальный или ректальный способы.

После приготовления фармацевтические композиции можно поместить в соответствующий контейнер и пометить для лечения указанного состояния. Такие пометки включают количество, частоту и способ введения.

Способы диагностики

Изобретение также обеспечивает диагностические способы, которыми можно обнаружить MN человека в исследуемых образцах, включая, без ограничения, образцы сыворотки, легких, печени, сердца, молочной железы, почки, ободочной кишки, системы культуры клеток или бесклеточной системы (например, гомогенат ткани). Такие способы диагностики можно применять, например, для диагностики заболеваний, при которых повышается уровень MN. К таким заболеваниям относятся, без ограничения, карциномы почки, пищевода, молочной железы, шейки матки, ободочной кишки и легких. При использовании в диагностике обнаружение в образце от пациента количества комплекса антитело-MN большего, чем количество этого комплекса в нормальных образцах, говорит о том, что у пациента возможно наличие заболевания. Иммуногистохимический метод обнаружения MN в раковых тканях описан в Примере 12.

Исследуемый препарат вводят в контакт с антителом человека согласно изобретению, а затем препарат исследуют на наличие комплекса антитело-MN. При желании антитело человека может содержать метку для детекции, например, флуоресцентную, радиоизотопную, хемилюминесцентную или ферментную, такую как пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза или люцифераза. Основанный на флуоресценции

анализ для обнаружения раковых клеток, экспрессирующих MN, описан в Примере 11.

При необходимости, антитело может быть связано с твердой основой, что делает возможным автоматизацию анализа. К подходящим твердым основам относятся, без ограничения, стеклянные или пластиковые пластины, планшеты для культур тканей, лунки для микротитрования, пробирки, кремниевые чипы или частицы, такие как бусины (включая, без ограничения, бусины из латекса, полистирола или стекла). Для прикрепления антитела к твердой основе можно применять любой метод, известный в данной области техники, включая применение ковалентного и нековалентного связывания, пассивной адсорбции или пар связывающихся фрагментов, соединенных с антителом и твердой основой. Связывание MN и антитела можно проводить в любом сосуде, подходящем для хранения реагентов. Примерами таких сосудов являются планшеты для микротитрования, пробирки и пробирки для микроцентрифугирования.

Терапевтические способы

Изобретение также обеспечивает способы облегчения симптомов заболевания, при котором повышается уровень MN. К этим заболеваниям относятся, без ограничения, карциномы почки, пищевода, молочной железы, шейки матки, ободочной кишки и легких. См., например, (Liao, S.Y., *Cancer Res* (1997) 57, 2827-2831), (Turner, J.R. *Hum Pathol* (1997) 28, 740-744), (Liao, S.Y., et.al, *Am J Pathol* (1994), 145, 598-609), (Saarnio, J. et al., *Am J Pathol* (1998) 153, 279-285) и (Vermylen, P. et al., *Eur Respir J* (1999) 14, 806-811).

В одном из способов осуществления изобретения терапевтически эффективную дозу антитела человека согласно изобретению вводят пациенту с заболеванием, при котором повышается уровень MN, таким как описанные выше случаи рака.

Определение терапевтически эффективной дозы

Определение терапевтически эффективной дозы находится в компетенции специалиста в данной области техники. Терапевтически эффективная доза означает количество антитела человека, применяемого для эффективного лечения рака по сравнению с эффективностью, наблюдаемой в отсутствие терапевтически эффективной дозы.

Терапевтически эффективную дозу сначала можно определить на модели животных, обычно крыс, мышей, кроликов, собак или свиней. Животную модель также можно использовать для определения подходящего интервала концентрации и способа введения. Затем эту информацию можно использовать для определения требуемых доз и путей введения человеку. Мышиная модель, полученная подкожной ксенотрансплантацией, описана в Примере 9.

Терапевтическую эффективность и токсичность, например, величины ED_{50} (доза, терапевтически эффективная у 50% популяции) и LD_{50} (доза, летальная для 50% популяции) антитела человека, можно определить стандартными фармацевтическими методами на культурах клеток или экспериментальных животных. Дозовое отношение токсического и терапевтического эффектов называется терапевтическим индексом, он выражается как отношение величин LD_{50}/ED_{50} .

Предпочтительными являются терапевтические композиции с высокими терапевтическими индексами. Данные, полученные в исследованиях на животных, используют для определения интервала доз для применения у человека. Доза, содержащаяся в композициях, предпочтительно находится в пределах циркулирующих концентраций, включающих ED_{50} при отсутствии или с малой токсичностью. Доза изменяется в этих пределах в зависимости от формы дозировки, чувствительности пациента и способа введения.

Точная дозировка определяется практикующим врачом с учетом факторов, связанных с пациентом, нуждающимся в лечении. Дозировку и способ введения корректируют для обеспечения достаточных уровней антитела человека или для поддержания требуемого эффекта. К принимаемым во внимание факторам относятся тяжесть заболевания, общее состояние здоровья пациента, возраст, вес и пол пациента, диета, время и частота введения, комбинация(и) лекарств, чувствительность реакции и переносимость/ответ на лечение. Долгодействующие фармацевтические композиции можно вводить каждые 3-4 дня, каждую неделю, или один раз в две недели, в зависимости от времени полужизни и уровня клиренса конкретного состава.

Полинуклеотиды, кодирующие антитела человека согласно изобретению, можно конструировать и вводить в клетку либо *ex vivo*, либо *in vivo*, используя хорошо из-

вестные методы, включающие, без ограничения, перенос ДНК посредством трансферрина-поликатиона, трансфекцию инкапсулированными или неинкапсулированными нуклеиновыми кислотами, клеточное слияние, опосредованное липосомами, внутриклеточную транспортировку латексных бусин, покрытых ДНК, протопластное слияние, вирусную инфекцию, электропорацию, "gene gun" и трансфекцию посредством DEAE или фосфата кальция.

Эффективные *in vivo* дозы антитела находятся в пределах приблизительно от 5 мкг до 50 мкг/кг, от 50 мкг до 5 мг/кг, от 100 мкг до 500 мкг/кг массы тела пациента, и от приблизительно 200 до 250 мкг/кг массы тела пациента. Для введения полинуклеотидов, кодирующих антитела, эффективные *in vivo* дозы находятся в пределах приблизительно от 100 нг до 200 нг, от 500 нг до 50 мг, от 1 мкг до 2 мг, от 5 мкг до 500 мкг и от приблизительно 20 мкг до 100 мкг ДНК.

Фармацевтические композиции согласно изобретению, содержащие антитело человека, можно вводить любым способом, доставляющим антитело хозяину. Фармацевтические композиции согласно изобретению особенно применимы для парентерального введения, т.е. подкожного, внутримышечного, внутривенного или интраназального введения.

Все патенты и заявки на патенты, процитированные в данном описании, прямо включены в настоящий документ посредством ссылки. Вышеприведенное описание раскрывает настоящее изобретение в общем. Более полное понимание может быть достигнуто ссылкой на следующие специфические примеры, которые приведены лишь с целью иллюстрации и не ограничивают объем настоящего изобретения.

ПРИМЕР 1

Конструирование комбинаторной библиотеки антител человека (HuCAL-Fab 1)

Клонирование HuCAL-Fab 1. HuCAL-Fab 1 – это полностью синтетическая, модульная библиотека антител в формате фрагментов антител Fab. HuCAL-Fab 1 была построена, исходя из библиотеки антител в одноцепочечном формате (HuCAL-scFv; Knappik et al., *J. Mol. Biol.* 296 (2000) 55). HuCAL-Fab 1 клонировали в фагемидный экспрессионный вектор pMORPH18 Fab1 (Фиг. 3). Этот вектор содержит фрагмент

Fd с сигнальной последовательностью rhoA, слитый С-концом с укороченным геном белка III филаментного фага, а также содержит легкую цепь VL-CL с сигнальной последовательностью ompA. Обе цепи находятся под контролем lac оперона. Константные домены C_L, C_K и C_H являются синтетическими генами, полностью совместимыми с модульной системой HuCAL (Knappik et al., 2000).

Сначала библиотеки V_L и V_K выделяют из HuCAL-scFv расщеплением ферментами рестрикции EcoRV/DraIII и EcoRV/BsiWI, соответственно. Эти библиотеки V_L и V_K клонировали в pMORPH18 FabI, расщепленный EcoRV/DraIII и EcoRV/BsiWI, соответственно. После лигирования и трансформации *E. coli* TG-1 были получены библиотеки размером $4,14 \times 10^8$ и $1,6 \times 10^8$, соответственно, в обоих случаях превышающие разброс HuCAL-scFv.

Аналогично, библиотеку V_H выделили из HCAL-scFv расщеплением ферментами рестрикции StyI/MunI. Эту библиотеку V_H клонировали в библиотеки pMORPH18-V_L и V_K, расщепленные StyI/MunI. После лигирования и трансформации *E. coli* TG-1 была получена библиотека общим размером $2,09 \times 10^{10}$ с 67% корректных клонов (определено секвенированием 207 клонов).

Спасение фагемиды, амплификация и очистка фага. HuCAL-Fab апплифицируют в среде 2 x TY, содержащей 34 мкг/мл хлорамфеникола и 1% глюкозы (2xTY-CG). После инфицирования фагом-помощником (VCSM13) при 37°C и оптической плотности OD₆₀₀ около 0,5, центрифугирования и ресуспендирования в среде 2xTY/ 34 мкг/мл хлорамфеникола/ 50 мкг/мг канамицина, клетки выращивали в течение ночи при 30°C. Фаг высаживали из супернатанта при помощи ПЭГ (Ausubel et al., 1998), ресуспендировали в PBS/20% глицерина и хранили при -80°C. Амплификацию фага между двумя раундами отбора проводят следующим образом: клетки TG-1 в фазе середины логарифмического роста инфицируют элюированным фагом и сеют на LB-агар с 1% глюкозы и 34 мкг/мл хлорамфеникола. После инкубации в течение ночи при 30°C колонии собирают и доводят до оптической плотности OD₆₀₀ 0,5. Добавляют фаг-помощник, как описано выше.

ПРИМЕР 2*Твердофазный отбор*

Лунки планшетов для микротитрования MaxiSorp™ (Nunc) покрывают белком MN человека в PBS (2 мкг/лунку). После блокировки 5% нежирным сухим молоком в PBS добавляют фаг 1-5 x 10¹² HuCAL-Fab, очищенный, как указано выше, на 1 час при 20°C. После нескольких этапов промывки связанный фаг собирают рН-элюированием 100 мМ триэтиламиноом с последующей нейтрализацией 1М трис-Cl pH 7,0. Проводят три раунда отбора, между раундами фаг амплифицируют, как описано выше.

ПРИМЕР 3*Субклонирование отобранных фрагментов Fab для экспрессии*

Кодирующие Fab вставки отобранных фрагментов HuCAL Fab субклонировывают в экспрессионный вектор pMORPHx7_FS для быстрой экспрессии растворимого Fab. Препарат ДНК отобранных клонов HuCAL Fab расщепляют *XbaI/EcoRI*, вырезая таким образом кодирующую Fab вставку (ompA-VL и rhoA-Fd). После субклонирования очищенных вставок в вектор pMORPHx7, расщепленный *XbaI/EcoRI*, ранее несший вставку scFv, получают вектор экспрессии Fab, обозначенный pMORPHx9_Fab1_FS (Фиг.4). Антитела Fab, экспрессируемые в этом векторе, несут две С-концевых метки (FLAG и Strep) для детекции и очистки.

ПРИМЕР 4*Идентификация фрагментов Fab, связывающихся с MN, методом ELISA*

Лунки планшетов для ELISA MaxiSorp покрывают растворами MN человека (100 мкл/лунку) с концентрацией 5 мкг/мл, разведенных в буфере для покрытия. Экспрессию отдельных Fab индуцируют добавлением 0,5 мМ IPTG (изопропилтиогалактозида) на 12 ч при 30°C. Растворимый Fab экстрагируют из периплазмы осмотическим шоком (Ausubel et al., 1998) и используют в ELISA. Фрагмент Fab определяют антителом анти-Fab (Dianova). После добавления конъюгированного с пероксидазой хрена мышинового антитела IgG и растворимого субстрата POD (Roche Diagnostics) считывают значения при 370 нм.

ПРИМЕР 5*Конструирование векторов экспрессии HuCAL иммуноглобулина*

Клонирование тяжелой цепи. Удаляют сайт множественного клонирования pcDNA3.1+ (Invitrogen) (NheI/ApaI) и делают вставку, совместимую с сайтами рестрикции, использованными для конструирования HuCAL, для лигирования лидерных последовательностей (NheI/EcoRI), доменов VH (EcoRI/BlnI) и константных областей иммуноглобулина (BlnI/ApaI). Лидерная последовательность (EMBL M83133) содержит последовательность Козак (Kozak, 1987). Константные области IgG1 (PIR J00228), IgG4 (EMBL K01316) и сывороточного IgA1 (EMBL J00220) человека расщепляют на перекрывающиеся олигонуклеотиды длиной около 70 оснований. Для удаления сайтов рестрикции, не совместимых с конструкцией HuCAL, вводят незначительные мутации. Олигонуклеотиды соединяют ПЦР продления с перекрыванием.

Клонирование легкой цепи. Сайт множественного клонирования pcDNA3.1Zeo+ (Invitrogen) заменяют двумя различными вставками. κ-Вставка содержит сайты рестрикции для вставки κ-лидерной последовательности (NheI/EcoRV), Vκ доменов HuCAL-scFv (EcoRV/BsiWI) и константной области κ-цепи (BsiWI/ApaI). В λ-вставке соответствующими сайтами рестрикции являются NheI/EcoRV (I-лидер), EcoRV/HpaI (домены VI) и HpaI/ApaI (константная область λ-цепи). И κ-лидер (EMBL Z00022), и λ-лидер (EMBL L27692) содержат последовательности Козак. Константные области κ- (EMBL J00241) и λ-цепи (EMBL M18645) человека собирают методом ПЦР продления с перекрыванием как описано выше.

Получение клеток CHO, экспрессирующих IgG. Проводят совместную трансфекцию клеток CHO-K1 эквимольной смесью векторов, экспрессирующих тяжелую и легкую цепи IgG. Дважды устойчивые трансфектанты отбирают с 600 мкг/мл G418 и 300 мкг/мл Zeocin (Invitrogen) с последующим конечным разведением. Супернатант отдельных клонов анализируют на экспрессию IgG методом "ловушечного иммуноферментного анализа" capture-ELISA (см. ниже). Положительные клоны наращивают в среде RPMI-1640 с 10% ультра-низкой IgG-FCS (эмбриональной сыворотки телят) (Life Technologies). После доведения pH супернатанта до 8,0 и стерильной фильтрации раствор подвергают стандартной колоночной хроматографии с белком A (Puros 20 A, PE Biosystems).

ПРИМЕР 6*Разработка (создание) библиотек CDR3*

VL, положения 1 и 2. Оригинальные основные гены HuCAL конструируют с их оригинальными N-концами: VL λ 1: QS (CAGAGC), VL λ 2: QS (CAGAGC) и VL λ 3: SY (AGCTAT). Последовательности, содержащие эти аминокислоты, приведены в WO 97/08320. При конструировании библиотеки HuCAL первые две аминокислоты заменяют на DI для клонирования библиотеки (сайт EcoRI). Все библиотеки HuCAL содержат гены VL λ с сайтом EcoRV GATATC (DI) на 5'-конце. Все каппа гены HuCAL (основные гены и все гены в библиотеке) содержат DI на 5'-конце.

VH, положение 1. Оригинальные основные гены HuCAL конструируют с их оригинальными N-концами: VH1A, VH1B, VH2, VH4 и VH6 с Q (=CAG) в качестве первой аминокислоты, а VH3 и VH5 с E (=GAA) в качестве первой аминокислоты. Последовательности, содержащие эти аминокислоты, приведены в WO 97/08320. В библиотеке HuCAL Fab 1 все цепи VH содержат в первом положении Q (=CAG).

Vk1/Vk3, положение 85. Из-за процедуры кассетного мутагенеза, использованной для введения библиотеки CDR3 (Кларрик et al., *J. Mol. Biol.* 296, 57-86, 2000), в положении 85 Vk1 и Vk3 может быть либо T, либо V. Таким образом, при создании библиотеки HuCAL scFv 1 положение 85 Vk1 или Vk3 изменяется следующим образом: оригинальная Vk1, 85T (кодон ACC); Vk1 в библиотеке, 85T или 85V (TRIM кодоны ACT или GTT); оригинальная Vk3, 85V (кодон GTG); Vk3 в библиотеке, 85T или 85V (TRIM кодоны ACT или GTT); то же относится и к библиотеке HuCAL Fab 1.

Создание CDR3. Все остатки CDR3, сохраненные неизменными, приведены в Таблицах 1 и 2.

Длина CDR3. Распределение длины созданной CDR3 следующее. Остатки, которые были изменены, приведены в Списке Последовательностей на Фиг.2. V каппа CDR3, 8 аминокислотных остатков (положения с 89 по 96) (иногда 7 остатков), с фиксированным Q90; V лямбда CDR3, от 8 до 10 аминокислотных остатков (положения с 89 по 96) (иногда 7-10 остатков), с фиксированными Q89, S90 и D92; VH CDR3, от 5 до

28 аминокислотных остатков (положения с 95 по 102) (иногда 4-28), с фиксированным D101.

ПРИМЕР 7

Конкурентный анализ ELISA для картирования эпитопов

Планшеты для микротитрования Nunc Maxisorb в течение ночи при 4°C покрывают 100 мкл MN или BSA, связанного с пептидом MN, в PBS в концентрации 5 мкг/мл. Каждую лунку блокируют 5% нежирным молоком в PBS в течение 2 часов при комнатной температуре на шейкере для планшетоов. Планшет промывают PBS с 0,05% Tween-20. В лунку добавляют 200 мкл антитела или смеси антитело+протеогликановый пептид А, В или С (SEQ ID 20-22). Концентрации антитела и протеогликанового пептида оптимизируют для наиболее удобного определения 50% конечной точки. Эти смеси антитело/пептид инкубируют 1,5 часа при комнатной температуре на шейкере для планшетоов. Планшеты ELISA быстро промывают 5 х TBS, содержащим 0,05% Tween-20. Связанные антитела проверяют при помощи конъюгированного с пероксидазой анти-Fab IgG козы (Sigma). После следующей промывки TBS-Tween добавляют 100 мкл субстрата BM Blue PD Substrate (Roche). После инкубации в течение 30 минут считывают поглощение при 370 нм.

ПРИМЕР 8

Исследование клеточной адгезии

1 мкг/мл очищенного MN в 50 мМ бикарбонатного буфера pH 9,2 адсорбируют в 30 мкл каплях на дне бактериологических 5 см чашек Петри в течение 1,5 часа. Удаляют капли и 3 раза промывают PBS. Затем капли блокируют 50% эмбриональной сывороткой телят в DMEM. Затем капли обрабатывают 30 мл растворов анти-MN IgG с концентрациями 20-100 мкг/мл или PBS и посторонних антител в качестве контроля. После промывки каплей PBS пятна инкубируют с 30 мкл суспензии клеток CGL-1 (10^5 клеток/мл) в течение ночи. После промывки каплей PBS оценивают способность антител анти-MN блокировать адгезию клеток CGL-1 к планшетам, покрытым MN. Пример этого эксперимента приведен на Фиг.5, где 20 мкг/мл анти-MN антитела MN-3 (Фиг.5А) ингибируют адгезию клеток по сравнению с контрольным гамма-глобулином (Фиг.5В) и отсутствием обработки антителом (Фиг.5С).

ПРИМЕР 9

Модель, полученная подкожной ксенотрансплантацией рака

Противоопухолевое действие антител анти-MN оценивают при использовании моде-
 5 лей иммунодефицитных мышей с подкожной ксенотрансплантацией. Клетки HT-29
 содержат в виде адгезионных культур в DMEM с 10% FBS (бычьей эмбриональной
 сыворотки). Мышам SCID в возрасте 6-7 недель в правый бок подкожно вводят 1×10^7
 10 клеток в 0,1 мл среды. Моноклональные антитела вводят внутривенно еже-
 дневно в дозе 500 мкг. Контрольных мышей обрабатывают PBS или посторонним
 моноклональным антителом. Опухоли измеряют дважды в неделю штангенцирку-
 15 лем. Противоопухолевую эффективность оценивают путем сравнения размера опу-
 холи при обработке антителами анти-MN и контрольной обработке.

ПРИМЕР 10

Модель, полученная подкожной ксенотрансплантацией рака, с иммуноконъюгатом

Антитела анти-MN конъюгируют с цитотоксичными небольшими молекулами, ис-
 20 пользуя методы, известные в данной области техники (например, C. Liu et al., *Proc.*
Natl. Acad. Sci. (1996), 93, 8618-8623). Клетки HT-29 содержат в виде адгезионных
 25 культур в DMEM с 10% FBS. Самкам мышей SCID CB-17 в возрасте 6-7 недель в
 правый бок подкожно вводят 1×10^7 клеток в 0,1 мл среды. После того, как размер
 30 опухоли достигнет 65 мм^3 , животным ежедневно вводят 0,5 мг конъюгата антитела в
 течение следующих пяти дней. Контрольным мышам вводят PBS, постороннее мо-
 ноклональное антитело или свободное неконъюгированное лекарство. Дважды в не-
 35 делю опухоли измеряют штангенциркулем. Противоопухолевую активность оцени-
 вают, сравнивая размеры опухолей при обработке антителом анти-MN и при кон-
 трольной обработке.

ПРИМЕР 11

Активированная флуоресценцией сортировка клеток (исследование FACS)

В качестве инструмента диагностики клетки можно исследовать на экспрессию MN.
 45 Клетки адгезионных клеточных культур отделяют от флакона, удаляя культураль-
 ную среду, промывая один раз ледяным PBS и обрабатывая 1 mM ЭДТА в PBS в те-
 чение 5-10 минут в зависимости от линии клеток (при периодическом постукивании
 50 флакона). Клетки осаждают центрифугированием (1500 об/мин, 5 мин) и один раз
 промывают ледяным буфером для окрашивания (10% FBS, 0,1% азид натрия, PBS).

Клетки ресуспендируют в ледяном буфере для окрашивания, в количестве 1 миллион
 клеток в 200 мкл. Добавляют первичное антитело в концентрации от $3,2 \times 10^{-11}$ до $3,2 \times 10^{-8}$ М и инкубируют на льду в течение 1 часа. Несвязавшиеся антитела смывают ле-
 дяным буфером для окрашивания. Осадок клеток ресуспендируют в 200 мкл ледяно-
 го буфера для окрашивания и добавляют 20 мкл вторичного антитела человека,
 конъюгированного с FITC (Pharmingen) на 200 мкл клеток. Инкубируют на льду 1
 час. Смывают несвязавшиеся антитела и ресуспендируют клетки в 200 мкл раствора
 пропидий йодида (PI) (Sigma) в буфере для окрашивания с концентрацией 2,5 мкг/мл
 (чтобы отметить погибшие клетки). Проводят анализ FACS, отмечая клетки, погло-
 щающие PI. На Фиг. 1 показано, что клетки простаты человека PC3mm2 экспресси-
 руют MN, что подтверждается анализом FACS. Красная линия показывает окраши-
 вание антителами человека анти-MN, черная – контроль, изотипически подобранное
 антитело человека.

ПРИМЕР 12

Иммуногистохимический анализ образцов опухоли

Срезы опухоли можно исследовать на экспрессию MN. Так как при раке уровень
 экспрессии MN высокий, а в нормальной ткани – низкий, анализ экспрессии MN
 может применяться для диагностики и обнаружения рака в образцах пациентов. Для
 анализа срезов тканей применяют стандартные иммуногистохимические методы.
 Срезы ткани, содержащей карциному простаты PC-3, имплантируют мышам SCID.
 20 мкг/мл антитела анти-MN инкубируют с депарафинизированным срезом и обра-
 батывают пластину, используя вторичное антитело, конъюгированное с пероксида-
 зой, и обрабатывают при использовании хромогена DAB. Наблюдают сильный сиг-
 нал, ассоциированный с мембраной, что является характерным для высокого уровня
 экспрессии MN в клетках рака простаты.

ПРИМЕР 13

Исследование зависимой от антитела опосредованной клетками цитотоксичности (исследование ADCC)

Противораковую активность иммуноглобулинов анти-MN IgG можно оценить по
 активности ADCC. Клетки PC-3mm2, экспрессирующие MN, и клетки HCT-116, не
 экспрессирующие MN, инкубируют с 250 нг/мл, 1000 нг/мл или 2000 нг/мл анти-MN
 IgG1 человека или контрольного анти-дигоксин IgG1. К этим клеткам добавляют

моноклеарные клетки периферической крови (РВМС) человека в соотношении
эффе́ктор:мише́нь 50:1, 25:1 и 5:1. Для определения уровня лизиса клеток-мишеней
проводят анализ высвобождения хро́ма-51. При инкубации контрольного антитела
или в отсутствие антитела в присутствии клеток НСТ-116 или РС-3mm2 наблюдает-
ся низкий уровень лизиса. Этот спонтанный уровень лизиса составляет 10-15%, 5-
10% или 2-3% для соотношений 50:1, 25:1 и 5:1, соответственно. Аналогично, лизис
не экспрессирующих клеток НСТ-116 находится в пределах 0-10% при инкубации с
антителами анти-MN. Однако, уровень лизиса клеток РС-3mm2 при инкубации с
иммуноглобулинами человека анти-MN IgG значительно выше, чем контрольный.
При концентрациях 250 нг/мл, 1000 нг/мл и 2000 нг/мл и соотношении ми-
ше́нь:эффе́ктор 50:1 наблюдают лизис 40, 50 и 60% клеток. Аналогично, при соот-
ношении 25:1 наблюдают лизис 30, 33 и 38% клеток и при соотношении 5:1 наблю-
дают лизис 8, 10 и 15% клеток. Эти эксперименты показывают, что антитела челове-
ка анти-MN опосредуют противоопухолевую зависимую от антитела опосредован-
ную клетками цитотоксическую активность (ADCC) и могут применяться для лече-
ния рака.

Таблицы 1 и 2

Примечания

Примечания, касающиеся перечня последовательностей HuCAL (библиотеки HuCAL scFv1, scFv2, scFv3 и Fab1)

1. Нумерация	Нумерация соответствует VBASE, за исключением пробела в VL, положение 9. В VBASE пробел находится в положении 10. См. также Chotia et al. (1992) J. Mol. Biol., 227, 776-798, Tomlinson et al. (1995) EMBO J., 14, 4628-4638 и Williams et al. (1996) J. Mol. Biol., 264, 220-232.
2. Сайты рестрикции	Положения сайтов приведены только приблизительно в последовательностях белков. Для точных положений используйте последовательности ДНК или файлы последовательностей VectorNTI Master Gene (можно найти в
3. V лямбда, положения 1 и 2:	Определили основные гены конструировали с оригинальными N-концами: VLλ1: QS (CAGAGC) VLλ2: QS (CAGAGC) VLλ3: SY (AGCTAT) Последовательности, содержащие эти аминокислоты, можно найти в заявке на патент или в файлах модели структуры PDB При конструировании библиотеки HuCAL эти две первые аминокислоты заменили на DI для клонирования библиотеки (сайт EcoRV) Все библиотеки HuCAL содержат гены VLλ с сайтом EcoRV GATATC (DI) на 5'-конце Все каппа гены HuCAL (основные гены и все гены библиотеки) содержат DI на 5'-конце.
4. VH, положение 1:	Оригинальные основные гены HuCAL конструировали с оригинальными N-концами: VH1A, VH1B, VH2, VH4 и VH5 с Q (=CAG) в качестве первой аминокислоты VH3 и VH5 с E (=GAA) в качестве первой аминокислоты Все VH цепи HuCAL, слитые с короткой последовательностью

5

FLAG (DYKD), содержат E (+GAA) в первом положении (библиотеки HuCAL scFv1, 2 и 3)

В библиотеке HuCAL Fab 1 все цепи VH содержат в первом положении Q (=CAG).

10

5. V_κ1/ V_κ3, При создании библиотеки HuCAL scFv 1 положение 85 V_κ1 и положение 85: V_κ3 было изменено:

оригинальная V_κ1: 85T (кодон ACC)

V_κ1 в библиотеке: 85T или 85V (TRIM кодоны ACT или GTT)

оригинальная V_κ3: 85V (кодон GTG)

15

V_κ3 в библиотеке: 85T или 85V (TRIM кодоны ACT или GTT)

То же относится и к библиотекам HuCAL scFv2 и 3, а также HuCAL Fab 1, соответственно положениям.

20

6. Конструирование CDR3: В списке последовательностей приведены все остатки CDR3, сохраненные константными.

25

7. Длина CDR3: Распределение длины созданной CDR3 следующее. В списке последовательностей измененные остатки приведены в скобках (х)

V каппа CDR3: 8 аминокислотных остатков (положения с 89 по 96) (иногда 7 остатков), с фиксированным Q90;

30

V лямбда CDR3: от 8 до 10 аминокислотных остатков (положения с 89 по 96) (иногда 7-10 остатков), с фиксированными Q89, S90 и D92;

35

VH CDR3: от 5 до 28 аминокислотных остатков (положения с 95 по 102) (иногда 4-28), с фиксированным D101.

40

45

50

Таблица 1

Перечень последовательностей библиотек HuCAL scFv1, scFv2, scFv3 и Fab1

VL

Положение			1			2			3		
			EcoRV			BamHI			PstI		
VLx1	D I	Q M T Q	S P	S S L S A S V G D R V T I T C							
VLx2	D I	V M T Q	S P	L S L P V T P G E P A S I S C							
VLx3	D I	V L T Q	S P	A T L S L S P G E R A T L S C							
VLx4	D I	V M T Q	S P	D S L A V S L G E R A T I N C							
VLx1	D I	V L T Q P P	-	S V S G A P G Q R V T I S C							
VLx2	D I	A L T Q P A	-	S V S G S P G Q S I T I S C							
VLx3	D I	E L T Q P P	-	S V S V A P G Q T A R I S C							
			EcoRV			SmaI			BstXI		

VH

Положение			1			2			3		
			NdeI			BspEI					
VH1A	Q V	Q L	V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S								
VH1B	Q V	Q L	V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S								
VH2	Q V	Q L	K E S G P A L V K P T Q T L T L Y C I T F S								
VH3	Q V	Q L	V E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S								
VH4	Q V	Q L	Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S								
VH5	Q V	Q L	V Q S G A E V K K P P G E S L K I S C K G S								
VH6	Q V	Q L	Q Q S G P G L V K P S Q T L S L T C A I S								

9										10										11									
8										9										10									
P E D										F A										Y Y C									
A E D										V G V										Y Y C									
P E D										F A										Y Y C									
A E D										V A V										Y Y C									
S E D										E A D										Y Y C									
A E D										E A D										Y Y C									
A E D										E A D										Y Y C									
Bbsf										Bbsf										Bbsf									

Страница: 29

Таблица 2

Перечень последовательностей библиотек HuCAL scFv1, scFv2, scFv3 и Fab1

VL

Положение	Рамка 1																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0
VLx1																				
VLx2																				
VLx3																				
VLx4																				
VLx11																				
VLx12																				
VLx13																				

VH

Положение	Рамка 1																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0
VH1A																				
VH1B																				
VH2																				
VH3																				
VH4																				
VH5																				
VH6																				

Таблица 2

[illegible]

Памка 2										Памка 3									
XmL										hPaV									
3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2
CAG	GCT	CAC	TGG	ATG	GAC					CAG	GCT	CAC	TGG	ATG	GAC				
CAG	GCT	CAC	TGG	ATG	GAC					CAG	GCT	CAC	TGG	ATG	GAC				
AAA	GCT	CAC	TGG	ATG	GAC					AAA	GCT	CAC	TGG	ATG	GAC				
AAG	GCT	CAC	TGG	ATG	GAC					AAG	GCT	CAC	TGG	ATG	GAC				
AAG	GCT	CAC	TGG	ATG	GAC					AAG	GCT	CAC	TGG	ATG	GAC				
AAG	GCT	CAC	TGG	ATG	GAC					AAG	GCT	CAC	TGG	ATG	GAC				
GCT	GCT	CAC	TGG	ATG	GAC					GCT	GCT	CAC	TGG	ATG	GAC				

Рамка 4

[illegible]

УТОЧНЕННЫЙ ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

5 <110> Toshihiko Takeuchi
 Nathalie Dubois-Stringfellow
 John E. Murphy
 Julie Rinkenberger

10 <120> Антитела человека, обладающие активностью связывания
 с MN и нейтрализации клеточной адгезии

<130> MSB-7289

15 <140> 10/273,541
 <141> 2002-10-18

<150> 60/434,657
 <151> 2001-10-18

20 <150> 60/377,716
 <151> 2002-05-02

<160> 89

<170> FastSEQ for windows Version 4.0

25 <210> 1
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

30 <400> 1
 ggatttacct ttagcgagag ggccatgacc
 30

35 <210> 2
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

40 <400> 2
 ggatttacct ttagcgcggc catgatgacg
 30

45 <210> 3
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 ggatttacct ttagcgggag catgatggcc
 30

50 <210> 4

<211> 30
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

5

<400> 4
 ggattttacct ttagcgactg ggcgatgacg
 30

10

<210> 5
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

15

<400> 5
 ggattttacct ttgtgaagag catggtggtg
 30

20

<210> 6
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

25

<400> 6
 ggattttacct ttagcaggaa cctgatgacc
 30

<210> 7
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

30

<400> 7
 ggattttacct ttgagcgggtg gatgggggagc
 30

35

<210> 8
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 ggattttacct ttagcaggag gatgatggtc
 30

40

<210> 9
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

45

<400> 9
 ggattttacct ttagcagggtg gatgatggtc
 30

50

<210> 10
 <211> 30
 <212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 10
ggattttacct ttagcgagag catgatgacg
30

5

<210> 11
<211> 30
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

10

<400> 11
ggattttacct ttagctggca catgatgacg
30

15

<210> 12
<211> 30
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

20

<400> 12
ggattttacct ttagctccgt gatgatgacg
30

25

<210> 13
<211> 30
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 13
ggattttacct ttagcgggag catgattacg
30

30

<210> 14
<211> 21
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

35

<400> 14
tctgctactc gttttgatta t
21

40

<210> 15
<211> 21
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 15
aatgggtactc gtatggatgt t
21

45

<210> 16
<211> 24
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

50

<400> 16
 ggtattgttc gtggtatgga tcat
 24

5

<210> 17
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

10

<400> 17
 ggtgggttctc gttatgatgt t
 21

15

<210> 18
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

20

<400> 18
 aatattacta agtctgattg tt
 22

25

<210> 19
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 ggtgggtactc gttttgatta t
 21

30

<210> 20
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

35

<400> 20
 aatgggtcgtatc atcttgatta t
 21

40

<210> 21
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 actgctactc gttttgatta t
 21

45

<210> 22
 <211> 45
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

50

<400> 22
 aagcctttta ctggtaagta ttgggggtcat actggttttg atatt

<210> 23
 <211> 45
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

5

<400> 23
 aaacctttta ctggaagta ttgggggtcat actggttttg atatt
 45

10

<210> 24
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

15

<400> 24
 aatggcctgc gtatggatgt t
 21

20

<210> 25
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 aatctgctgc gtatggatgt t
 21

25

<210> 26
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

30

<400> 26
 aatgcggtgc gtatggatgt t
 21

35

<210> 27
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 aatgcgatgc gtatggatgt t
 21

40

<210> 28
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

45

<400> 28
 aatgccctcc gtatggatgt t
 21

50

<210> 29
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 29
 aatgtgctgc gtatggatgt t
 21
 <210> 30
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 10
 <400> 30
 ggggggacgc gtatggatgt t
 15 21
 <210> 31
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 20
 <400> 31
 cagggcaccc gtatggatgt t
 21
 <210> 32
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 25
 <400> 32
 aatggcgtgc gtatggatgt t
 30 21
 <210> 33
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 35
 <400> 33
 aatggcatcc gtatggatgt t
 40 21
 <210> 34
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 45
 <400> 34
 cagagccgtg actatgagaa gcctatgatt
 30
 <210> 35
 <211> 30
 50

<212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 35
 cagagccgag actatgagaa gcctatgatt
 30

<210> 36
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 36
 cagagccgag actatgagaa gcctatgatt
 30

<210> 37
 <211> 42
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 37
 acgggtacta gcagcgatag gacgcgcccg ccgaagtacg cc
 42

<210> 38
 <211> 42
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 38
 acgggtacta gcagcgatgt gtccggcctc aacatcgtgt cc
 42

<210> 39
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 39
 cagagctatg accgtgcttt taagtctgtt
 30

<210> 40
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 40
 cagagctatg accataagaa gactgag
 27

<210> 41
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 41
cagagctatg acatgtttgc tcgtgttatt
30

5 <210> 42
<211> 30
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

10 <400> 42
cagagctatg accgtcttta taagaagctt
30

15 <210> 43
<211> 30
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 43
cagagctatg accgggctta tcgacttctt
30

20 <210> 44
<211> 27
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

25 <400> 44
cagagctatg accgttctcg ttatgct
27

30 <210> 45
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45
Gly Glu Glu Asp Leu Pro Ser Glu Glu Asp Ser Pro Arg Glu Glu Asp
35 1 5 10 15
Pro Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro
20 25 30

40 <210> 46
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

45 <400> 46
Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro
1 5 10

50 <210> 47

<211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 47
 Pro Ser Glu Glu Asp Ser Pro Arg Glu Glu Asp Pro
 1 5 10

10

<210> 48
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 48
 Gly Phe Thr Phe Ser Glu Arg Ala Met Thr
 1 5 10

20

<210> 49
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25

<400> 49
 Gly Phe Thr Phe Ser Ala Ala Met Met Thr
 1 5 10

30

<210> 50
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35

<400> 50
 Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser Met Met Ala
 1 5 10

40

<400> 51
 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Trp Ala Met Thr
 1 5 10

45

<210> 52
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

50

<400> 52
 Gly Phe Thr Phe Val Lys Ser Met Val Val

1 5 10

5

<210> 53
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 53
 Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn Leu Met Thr
 1 5 10

15

<210> 54
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 54
 Gly Phe Thr Phe Glu Arg Trp Met Gly Ala
 1 5 10

25

<210> 55
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 55
 Gly Phe Thr Phe Ser Arg Arg Met Met Val
 1 5 10

30

<210> 56
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35

<400> 56
 Gly Phe Thr Phe Ser Arg Trp Met Met Val
 1 5 10

40

<210> 57
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45

<400> 57
 Gly Phe Thr Phe Ser Glu Ser Met Met Thr
 1 5 10

50

<210> 58
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Gly Phe Thr Phe Ser Trp His Met Met Thr
1 5 10

5

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 59

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Val Met Met Thr
1 5 10

15

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 60

Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser Met Met Thr
1 5 10

25

<210> 61

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 61

Ser Ala Thr Arg Phe Asp Tyr
1 5

35

<210> 62

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40

<400> 62

Asn Gly Thr Arg Met Asp Val
1 5

45

<210> 63

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Gly Ile Val Arg Gly Met Asp His
1 5

50

<210> 64
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 64
Gly Gly Ser Arg Tyr Asp Val
1 5

10

<210> 65
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15

<400> 65
Asn Ile Thr Lys Ser Asp Val
1 5

20

<210> 66
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25

<400> 66
Gly Gly Thr Arg Phe Asp Tyr
1 5

30

<210> 67
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35

<400> 67
Asn Gly Arg Asn Leu Asp Tyr
1 5

40

<210> 68
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

45

<400> 68
Thr Ala Thr Arg Phe Asp Tyr
1 5

50

<210> 69
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 69

Lys Pro Phe Thr Gly Lys Tyr Trp Gly His Thr Gly Phe Asp Ile
 1 5 10 15

5

<210> 70

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 70

Lys Pro Phe Thr Gly Lys Tyr Trp Gly His Thr Gly Phe Asp Ile
 1 5 10 15

15

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 71

Asn Gly Leu Arg Met Asp Val
 1 5

25

<210> 72

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 72

Asn Leu Leu Arg Met Asp Val
 1 5

35

<210> 73

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40

<400> 73

Asn Ala Val Arg Met Asp Val
 1 5

45

<210> 74

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Asn Ala Met Arg Met Asp Val
 1 5

50

<210> 75

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 75
 Asn Ala Leu Arg Met Asp Val
 1 5

10

<210> 76
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 76
 Asn Val Leu Arg Met Asp Val
 1 5

20

<210> 77
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25

<400> 77
 Gly Gly Thr Arg Met Asp Val
 1 5

30

<210> 78
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 78
 Gln Gly Thr Arg Met Asp Val
 1 5

35

<210> 79
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40

<400> 79
 Asn Gly Val Arg Met Asp Val
 1 5

45

<210> 80
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

50

<400> 80
 Asn Gly Ile Arg Met Asp Val

1 5

5

<210> 81
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 81
 Gln Ser Arg Asp Tyr Glu Lys Pro Met Ile
 1 5 10

15

<210> 82
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 82
 Thr Gly Thr Ser Ser Asp Arg Thr Arg Pro Pro Lys Tyr Ala
 1 5 10

25

<210> 83
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 83
 Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Ser Gly Leu Asn Ile Val Ser
 1 5 10

30

<210> 84
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35

<400> 84
 Gln Ser Tyr Asp Arg Ala Phe Lys Ser Val
 1 5 10

40

<210> 85
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45

<400> 85
 Gln Ser Tyr Gly His Lys Lys Thr Glu
 1 5

50

<210> 86
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Gln Ser Tyr Asp Met Phe Ala Arg Val Ile
1 5 10

<210> 87

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Gln Ser Tyr Asp Arg Leu Tyr Lys Lys Leu
1 5 10

<210> 88

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Gln Ser Tyr Asp Arg Ala Tyr Arg Leu Leu
1 5 10

<210> 89

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Gln Ser Tyr Asp Arg Ser Arg Tyr Ala
1 5

Формула изобретения

1. Очищенный препарат антитела человека, содержащего по меньшей мере одну область, выбранную из группы, включающей область VH3-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, включающей последовательности SEQ ID NOS: 61-80, область VH3-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, включающей последовательности SEQ ID NOS: 48-60, область VL λ 1-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под номером SEQ ID NO: 81, область VL λ 2-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, включающей последовательности SEQ ID NOS: 82-83, или область VL λ 2-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, включающей последовательности SEQ ID NOS: 84-89, при этом указанное антитело связывает белок MN.

2. Очищенный препарат по п.1, причем антитело связывается с протеогликановым доменом белка MN.

3. Очищенный препарат по п.1, причем антитело связывается с областью повтора GEEDLP внутри протеогликанового домена белка MN.

4. Очищенный препарат по п.3, причем антитело связывается с белком MN человека с K_d от около 0,6 до около 1800 нМ.

5. Очищенный препарат по п.3, причем антитело связывается с белком MN человека с K_d от около 0,6 до около 90 нМ.

6. Очищенный препарат по п.1, в котором антитело человека содержит область VH3-

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64.

7. Очищенный препарат по п.1, в котором антитело человека содержит пару аминокислотных последовательностей VH3-CDR3 и VL2-CDR3, выбираемых из группы, включающей последовательности SEQ ID NOS: 61 и 84, SEQ ID NOS: 62 и 87, SEQ ID NOS: 63 и 89, SEQ ID NOS: 64 и 84, SEQ ID NOS: 65 и 84, SEQ ID NOS: 66 и 85, SEQ ID NOS: 67 и 88.

8. Очищенный препарат по п.1, в котором антитело человека содержит пару аминокислотных последовательностей VH3-CDR3 и VL2-CDR3, выбираемых из группы, включающей последовательности SEQ ID NOS: 61 и 86, SEQ ID NOS: 61 и 85, SEQ ID NOS: 61 и 87, SEQ ID NOS: 61 и 88, SEQ ID NOS: 61 и 89, SEQ ID NOS: 63 и 86, SEQ ID NOS: 63 и 85. SEQ ID NOS: 63 и 87, SEQ ID NOS: 63 и 88, SEQ ID NOS: 63 и 84.

9. Очищенный препарат по п.1, в котором антитело человека содержит пару аминокислотных последовательностей VH3-CDR3 и VL2-CDR3, выбираемых из группы, включающей последовательности SEQ ID NOS: 71 и 87, SEQ ID NOS: 61 и 87, SEQ ID NOS: 72 и 87, SEQ ID NOS: 73 и 87, SEQ ID NOS: 74 и 87, SEQ ID NOS: 75 и 87, SEQ ID NOS: 76 и 87, SEQ ID NOS: 77 и 87, SEQ ID NOS: 78 и 87, SEQ ID NOS: 79 и 87, SEQ ID NOS: 80 и 87.

10. Очищенный препарат по п.1, причем антитело человека содержит пару аминокислотных последовательностей VH3-CDR3 и VL1-CDR3, выбираемых из группы, включающей последовательности SEQ ID NOS: 61 и 81, SEQ ID NOS: 69 и 81, SEQ ID NOS: 70 и 81.

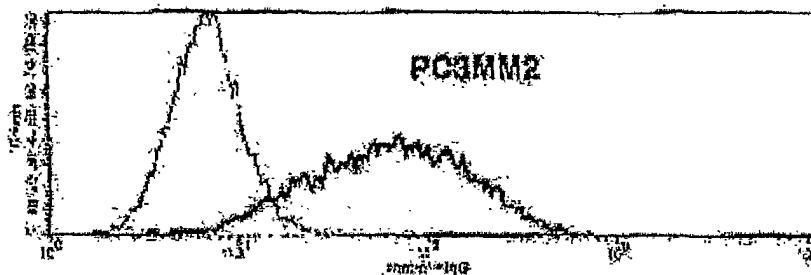
11. Очищенный препарат по п.1, причем антитело человека содержит аминокислотные последовательности VH3-CDR3, VL2-CDR3 и VH3-CDR1, выбираемые из группы, включающей последовательности SEQ ID NOS: 61 и 86 и 48, SEQ ID NOS: 61 и 86 и 49, SEQ ID NOS: 61 и 86 и 50, SEQ ID NOS: 61 и 86 и 51, SEQ ID NOS: 61 и 86 и 52, SEQ ID NOS: 61 и 86 и 53, SEQ ID NOS: 61 и 86 и 54, SEQ ID NOS: 61 и 86 и 55, SEQ ID NOS: 61 и 86 и 56, SEQ ID NOS: 61 и 86 и 57.

Приоритет по пунктам и признакам:

18.10.2001 по пп.2; 3; 6-8; 10; 1 в части SEQ ID NO: 61-70, 81 и 84-89; 4 в части 4,7-1800 нМ; 5 в части 4-90 нМ; 9 в части SEQ ID NO: 61 и 87; 11 в части SEQ ID NO: 61 и 86;

02.05.2002 по п.1 в части SEQ ID NO: 52-60; 4 и 5 в части 0,6 нМ; 11 в части SEQ ID NO: 52-57;

18.10.2002 по п.1 в части SEQ ID NO: 48-51, 71-80 и 82-83; 4 в части $0,6 < K_d < 4,7$ нМ; 5 в части $0,6 < K_d < 4$ нМ; 9 в части SEQ ID NO: 71-80; 11 в части SEQ ID NO: 48-51.



ФИГ. 1

Информация о последовательностях

SEQ ID. #	Информация о последовательности	Последовательность ДНК
	VH3-CDR1	
1	1	GGATTACCTTTAGCGAGAGGGCCATGACC
2	2	GGATTACCTTTAGCGCGGGCCATGATGACG
3	3	GGATTACCTTTAGCGGGAGCATGATGGCC
4	4	GGATTACCTTTAGCGACTGGCCGATGACG
5	5	GGATTACCTTTGTGAAGACCATGGTGGTG
6	6	GGATTACCTTTAGCAGGAACCTGATGACC
7	7	GGATTACCTTTAGCGGGTGGATGGGGCCG
8	8	GGATTACCTTTAGCAGGAGGATGATGGTC
9	9	GGATTACCTTTAGCAGGTGGATGATGGTC
10	10	GGATTACCTTTAGCGAGAGCATGATGACG
11	11	GGATTACCTTTAGCTGGCAGCATGATGACG
12	12	GGATTACCTTTAGCTCCGTGATGATGACG
13	13	GGATTACCTTTAGCGGGAGCATGATGACG
	VH3-CDR3	
14	1	TCTGCTACTCGTTTGGATTAT
15	2	AATGGTACTCGTATGGATGTT
16	3	GGTATTGTTCTGGTGGTATGGATCAT
17	4	GGTGGTTCGGTTATGATGTT
18	5	AATATTACTAAGTCTGATGTT
19	6	GGTGGTACTCGTTTGGATTAT
20	7	AATGGTCGTAATCTTGATTAT
21	8	ACTGCTACTCGTTTGGATTAT
22	9	AAGCCCTTTACTGGTAAGTATTGGGGTCATACTGGTTTGGATATT
23	10	AAACCTTTTACTGGTAAGTATTGGGGTCATACTGGTTTGGATATT
24	11	AATGGCCTGCGTATGGATGTT
25	12	AATCTGCTGCGTATGGATGTT
26	13	AATGCGGTGCGTATGGATGTT
27	14	AATGCGATGCGTATGGATGTT
28	15	AATGCGCTGCGTATGGATGTT
29	16	AATGTGCTGCGTATGGATGTT
30	17	GGGGGGACGCGTATGGATGTT
31	18	CAGGGCAGCCGTATGGATGTT
32	19	AATGGCGTGCGTATGGATGTT
33	20	AATGGCATCGTATGGATGTT

ФИГ. 2

Информация о последовательностях

	VL1-CDR3	
34	1	CAGAGCCGTGACTATGAGAAGCCTATGATT
35	2	CAGAGCCGAGACTATGAGAAGCCTATGATT
36	3	CAGAGCCGCGACTATGAGAAGCCTATGATT
	VL2-CDR1	
37	1	ACGGGTACTAGCAGCGATAGGACGCGCCGCCGAAAGTACGCC
38	2	ACGGGTACTAGCAGCGATGTGTCCGCCCTCAACATCGTGTCC
	VL2-CDR3	
39	1	CAGAGCTATGACCGTGCTTTTAAGTCTGTT
40	2	CAGAGCTATGACCATAAGAAGACTGAG
41	3	CAGAGCTATGACATGTTTGCTCGTGTATT
42	4	CAGAGCTATGACCGTCTTTATAAGAAGCTT
43	5	CAGAGCTATGACCGGCTTATCGACTTCTT
44	6	CAGAGCTATGACCGTTCTCGTATGCT
45	proteoglycan A	GEEDLPSEEDSPREEDPPGEEDLPGEEDLP
46	proteoglycan B	PGEEDLPGEEDLP
47	proteoglycan C	PSEEDSPREEDP
	VH3-CDR1	
48	1	GFTFSERAMT
49	2	GFTFSAAMMT
50	3	GFTFSGSMMMA
51	4	GFTFSDWAMT
52	5	GFTFVKSMVV
53	6	GFTFSRNLMT
54	7	GFTFERWMGA
55	8	GFTFSRRMMV
56	9	GFTFSRWMMV
57	10	GFTFSESMMT
58	11	GFTFSWHMMT
59	12	GFTFSGVMMT
60	13	GFTFSGSMMT

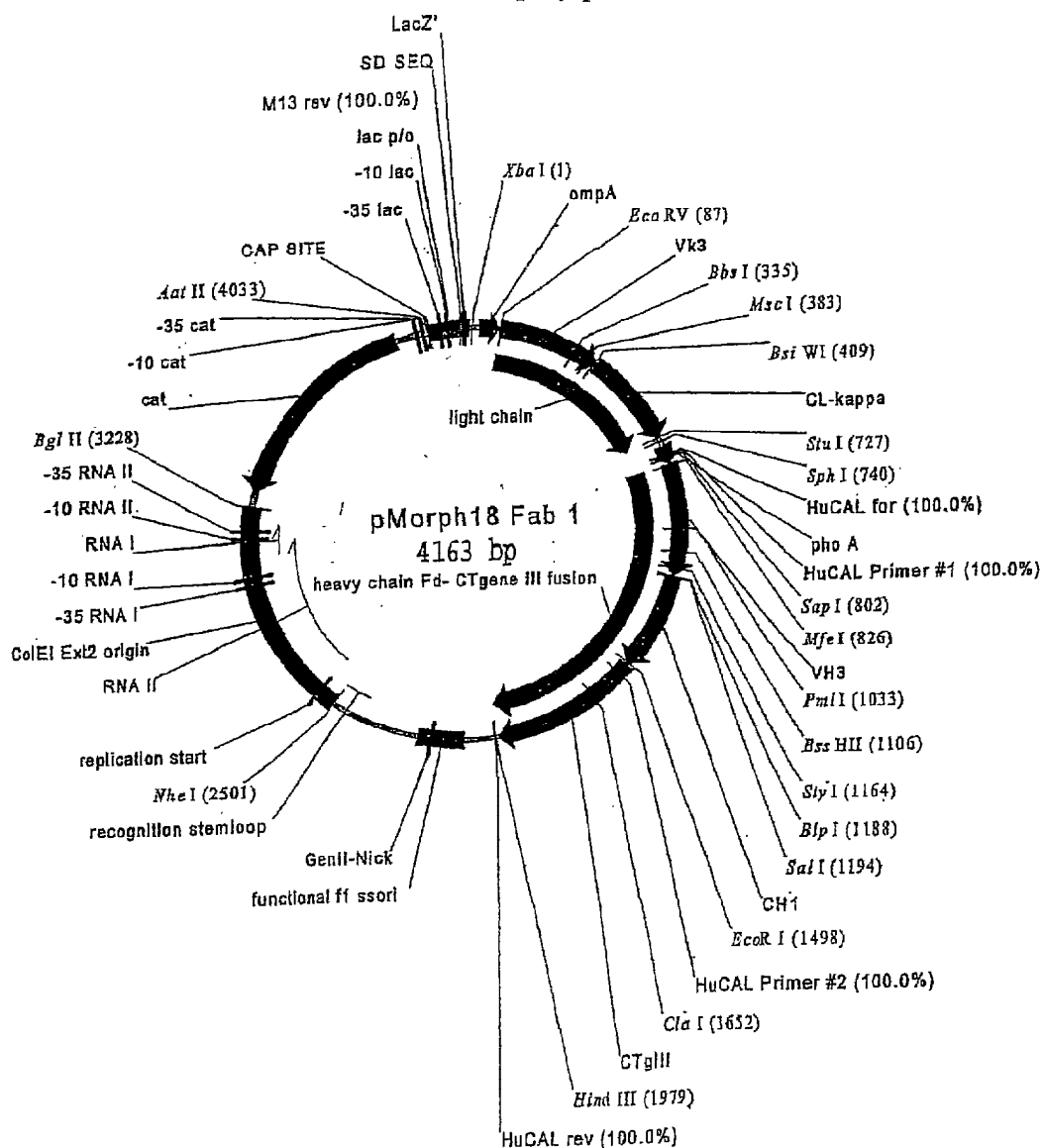
Фиг.2 (продолжение)

Информация о последовательностях

	VH3-CDR3	Аминокислотная последовательность
61	1	SATRFDY
62	2	NGTRMDV
63	3	GIVRGMDH
64	4	GGSRYDV
65	5	NITKSDV
66	6	GGTRFDY
67	7	NGRNLDY
68	8	TATRFDY
69	9	KPFTGKYWGHTGFDI
70	10	KPFTGKYWGHTGFDI
71	11	NGLRMDV
72	12	NLLRMDV
73	13	NAVRMDV
74	14	NAMRMDV
75	15	NALRMDV
76	16	NVLRMDV
77	17	GGTRMDV
78	18	QSTRMDV
79	19	NGVRMDV
80	20	NGIRMDV
	VL1-CDR3	
81	1	QSRDYEKPMI
	VL2-CDR1	
82	1	TGTSSDRTRPPKYA
83	2	TGTSSDVSGLNIVS
	VL2-CDR3	
84	1	QSYDRAFKSV
85	2	QSYGHKKTE
86	3	QSYDMFARVI
87	4	QSYDRLYKKL
88	5	QSYDRAYRLL
89	6	QSYDRSRYA

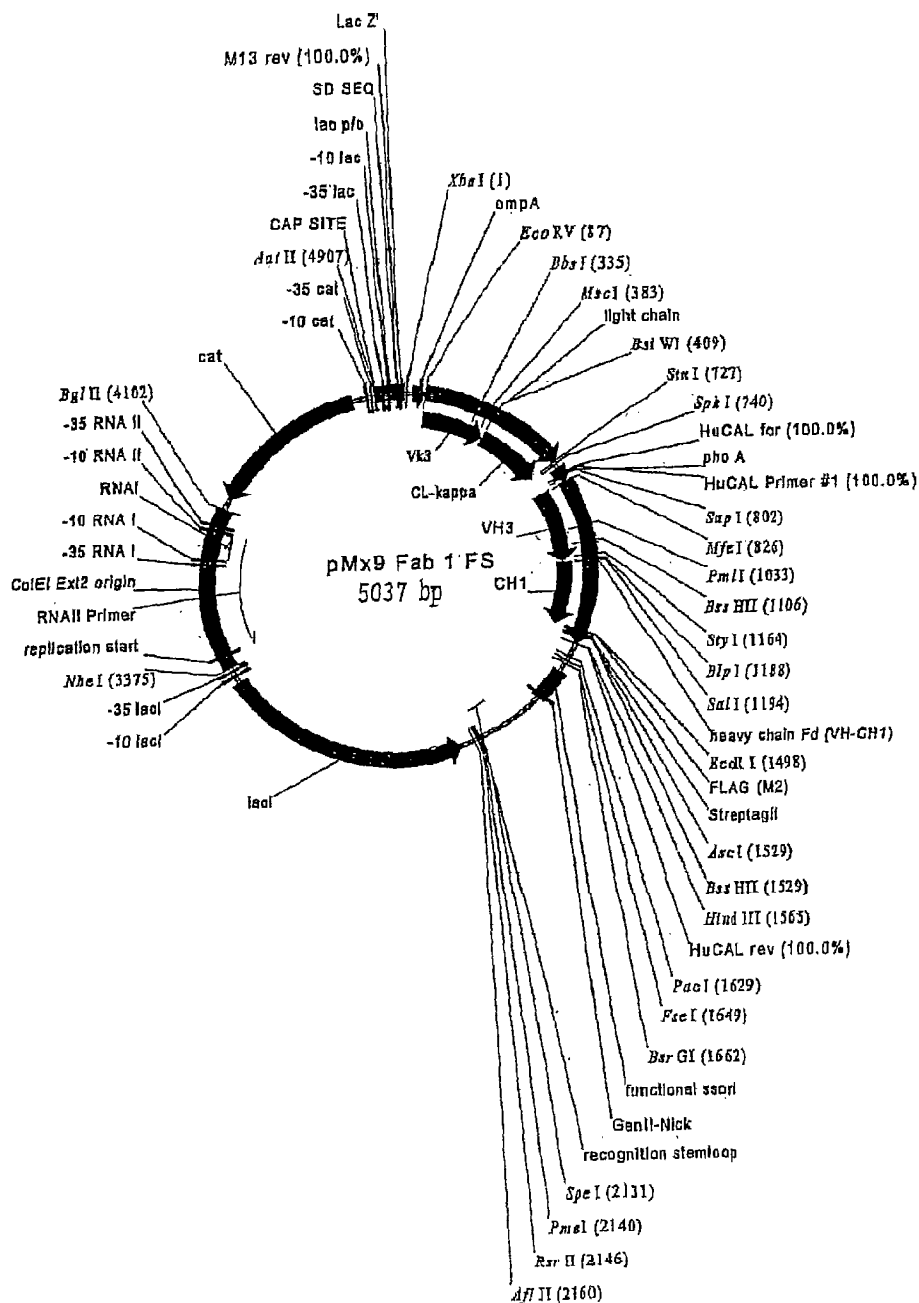
Фиг.2 (продолжение)

Вектор Fab display pMORPH18 Fab 1



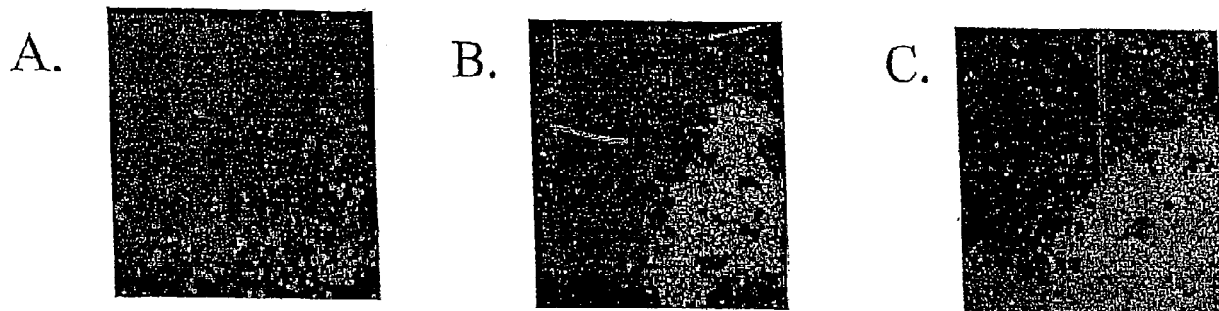
ФИГ. 3

Карта вектора pMORPHx9_Fab1_FS



ФИГ. 4

Блокировка клеточной адгезии анти-MN антителом MN-3



А. 20 мкг/мл антитела MN-3

В. 20 мкг/мл гамма-глобулина человека

С. Без обработки антителом

ФИГ. 5

Пары тяжелая/легкая цепь

Антитело	Тяжелая цепь/ легкая цепь	Приблизительная аффинность по BIAcore к BSA, меченному протеогликановым пептидом MN человека	Ингибирование сигнала ELISA протеогликановым пептидом В (1 мг/мл)	Ингибирование в исследовании связывания клеток MN (100 мкг/мл Fab)
1	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-1	1.82E-06	75.00%	>95%
2	VH3-CDR3-2/VL2-CDR3-4	3.96E-08	93.00%	>95%
3	VH3-CDR3-3/VL2-CDR3-6	4.65E-09	74.00%	>95%
4	VH3-CDR3-4/VL2-CDR3-1	6.40E-06	75.00%	ND
5	VH3-CDR3-5/VL2-CDR3-1	8.56E-07	32.00%	ND
6	VH3-CDR3-6/VL2-CDR3-2	ND	40.00%	ND
7	VH3-CDR3-7/VL2-CDR3-5	ND	51.00%	ND
8	VH3-CDR3-1/VL1-CDR3-1	ND	73.00%	ND
9	VH3-CDR3-9/VL1-CDR3-1	ND	ND	ND
10	VH3-CDR3-9/VL1-CDR3-2	ND	ND	ND
11	VH3-CDR3-9/VL1-CDR3-3	ND	ND	ND
12	VH3-CDR3-10/VL1-CDR3-1	ND	ND	ND
13	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3	6.03E-08	ND	ND
14	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-2	ND	ND	ND
15	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-4	9.00E-08	ND	ND
16	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-5	9.90E-08	ND	ND
17	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-6	ND	ND	ND
18	VH3-CDR3-8/VL2-CDR3-3	ND	ND	ND
19	VH3-CDR3-3/VL2-CDR3-2	ND	ND	ND
20	VH3-CDR3-3/VL2-CDR3-4	ND	ND	ND
21	VH3-CDR3-3/VL2-CDR3-5	ND	ND	ND
22	VH3-CDR3-3/VL2-CDR3-1	ND	ND	ND
ND = не определено				

ФИГ. 6

Пары тяжелая/легкая цепь

Антитело	Тяжелая цепь/ легкая цепь	Приблизительная аффинность по BIAcore к BSA, меченному протеогликановым пептидом MN человека	Ингибирование сигнала ELISA протеогликановым пептидом В (1 мг/мл)	Ингибирование в исследовании связывания клеток MN (100 мкг/мл Fab)
23	VH3-CDR1-1/VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3	5.84E-09	ND	ND
24	VH3-CDR1-2/VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3	3.31E-09	ND	ND
25	VH3-CDR1-3/VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3	4.89E-09	ND	ND
26	VH3-CDR1-4/VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3	3.57E-09	ND	ND
27	VH3-CDR3-1/VL2-CDR1-1/VL2-CDR3-3	9.47E-09	ND	ND
28	VH3-CDR3-1/VL2-CDR1-2/VL2-CDR3-3	3.95E-09	ND	ND
29	VH3-CDR3-11/VL2-CDR3-4	8.19E-09	ND	ND
30	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-4	3.91E-09	ND	ND
31	VH3-CDR3-12/VL2-CDR3-4	1.23E-09	ND	ND
32	VH3-CDR3-13/VL2-CDR3-4	1.34E-09	ND	ND
33	VH3-CDR3-14/VL2-CDR3-4	1.23E-09	ND	ND
34	VH3-CDR3-15/VL2-CDR3-4	1.61E-09	ND	ND
35	VH3-CDR3-16/VL2-CDR3-4	1.31E-09	ND	ND
36	VH3-CDR3-17/VL2-CDR3-4	2.87E-09	ND	ND
37	VH3-CDR3-18/VL2-CDR3-4	2.82E-09	ND	ND
38	VH3-CDR3-19/VL2-CDR3-4	1.43E-09	ND	ND
39	VH3-CDR3-20/VL2-CDR3-4	1.66E-09	ND	ND
40	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3/VH3-CDR1-1	1.82E-08	ND	ND
41	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3/VH3-CDR1-2	5.70E-09	ND	ND
42	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3/VH3-CDR1-3	6.00E-10	ND	ND
43	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3/VH3-CDR1-4	N.D.	ND	ND
44	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3/VH3-CDR1-5	2.00E-09	ND	ND
45	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3/VH3-CDR1-6	6.00E-10	ND	ND
46	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3/VH3-CDR1-7	8.00E-10	ND	ND
47	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3/VH3-CDR1-8	4.10E-09	ND	ND
48	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3/VH3-CDR1-9	1.20E-09	ND	ND
49	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3/VH3-CDR1-10	1.00E-09	ND	ND

Фиг.6 (продолжение)